

PCT/FR03/01248

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 AVR. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

REMISE DES PIÈCES DATE <b>19 AVRIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>19 AVR. 2002</b> Vos références pour ce dossier (facultatif) 48.884		Réservé à l'INPI <b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET PEUSCET 78, avenue Raymond Poincaré 75116 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> DERIVES DE STEROLS, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET MEDICAMENTS LES COMPORTANT			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public, Scientifique et Technologique	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	101, rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	75013	PARIS 13
Pays		FR	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>19 AVRIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0204012</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI		08 540 W / 260899	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>			48.884		
<b>6 MANDATAIRE</b>					
Nom			ABELLO		
Prénom			Michel		
Cabinet ou Société			CABINET PEUSCET		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel					
Adresse	Rue	78, avenue Raymond Poincaré			
	Code postal et ville	75116	PARIS		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 45 02 60 00			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>					
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>					
<b>7 INVENTEUR (S)</b>					
Les inventeurs sont les demandeurs			<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé			<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance			Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>			Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes					
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Michel ABELLO (CPI 96-0702)				<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	

L'invention a pour objet de nouveaux dérivés de stérols, un nouveau procédé permettant l'obtention de ces composés et l'utilisation desdits composés, d'une part, pour la production de vacuoles sécrétoires dans des cellules tumorales pour augmenter la dendritogénèse et, d'autre  
 5 part, comme médicament pour l'activation du système immunitaire, notamment en vue de la régression de tumeurs cancéreuses.

La dendritogénèse est une modification morphologique des cellules qui intervient notamment dans le système nerveux et dans le système immunitaire. Dans le système immunitaire, la dendritogénèse  
 10 conduit à la génération de cellules dendritiques à partir de monocytes. Ces phénomènes physiologiquement importants ne sont pas bien compris à ce jour, mais ils sont associés à une augmentation de l'activité sécrétoire des cellules (MARTINEZ-ARCA S. et coll., 2001, J. Neurosci, 21 (11), 3830-38 et DENZER K et coll., 2000, J. Cell. Sci.,  
 15 113 Pt 19, 3365-74). Ces phénomènes sont induits par des facteurs de croissance et des cytokines. La différenciation de monocytes en cellules dendritiques (CD) est induite par le co-traitement des monocytes avec l'interleukine 4 (IL4/GM-CSF), l'activation des CD requérant en outre un traitement au TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha).

Il est connu que les cellules tumorales sont antigéniques et expriment à leur surface des antigènes spécifiquement reconnus par les lymphocytes. Ces antigènes sont des peptides chargés sur les molécules du CMH de classe I : un lymphocyte T CD8<sup>+</sup> spécifique reconnaît ce  
 20 complexe CMH-peptide. On a montré que les CD modifiées ex vivo pour présenter des antigènes tumoraux induisaient une immunité spécifique prévenant et/ou éradiquant des tumeurs établies chez la souris (Schuler P. Steinman RM, J. Exp. Med. 1997, 8, 1183-7 et Angevin, André, Zitvogel, Bull Cancer, 2000, 87(1), 107-15). On a donc  
 25 considéré que les DC sont des adjuvants puissants pour l'induction d'une réponse immunitaire thérapeutique.

A ce jour, la thérapie cellulaire concerne donc des méthodes pour générer ex vivo des CD humaines à usage clinique.

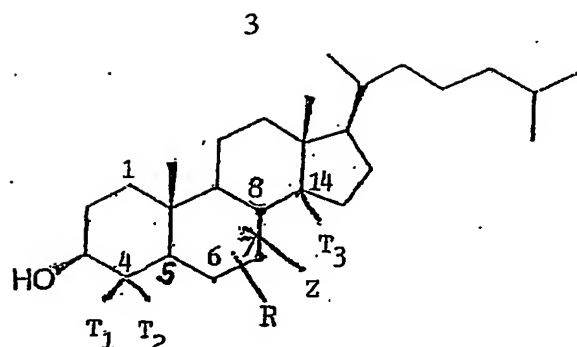
Dans le cas du cancer du sein notamment, on a déjà proposé de prélever sur le patient des cellules monocytaires et de les cultiver en  
 35 présence d'une association de cytokines et de l'antigène à présenter ; les cellules dendritiques obtenues par dendritogénèse ont été réinjectées aux

patientes pour développer les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène (Lawrence Fong et Edgar G. Engleman, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18, 245-273).

5 L'état de la technique, qui vient d'être exposé, met en évidence les inconvénients inhérents à ces méthodes. En effet, la sensibilisation des cellules dendritiques utilise des peptides dérivés d'antigènes tumoraux ; or, dans la majorité des tumeurs les antigènes spécifiques n'ont pas été identifiés. De plus, pour sensibiliser les cellules dendritiques, on utilise généralement des peptides identifiés dans les cellules tumorales grâce à  
10 des clones de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur ; or, les épitopes présentés par les cellules tumorales et ceux présentés par les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes ne sont probablement pas les mêmes. Au surplus, lorsqu'on utilise des cellules dendritiques-soumises aux différents traitements ex-vivo ci-dessus évoqués, il peut se  
15 produire des changements phénotypiques conduisant à des populations cellulaires hétérogènes peu adaptées à un usage thérapeutique. Il est donc hautement désirable d'améliorer les méthodes d'obtention de cellules dendritiques sensibilisées, pour permettre un développement de l'immunothérapie.

20 L'invention est basée sur le fait que l'on a constaté que, de façon tout à fait surprenante, l'on pouvait induire in vivo la différenciation de monocytes en cellules dendritiques par une classe de composés nouveaux dérivés de stéroïdes. Jusqu'à présent, l'utilisation de composés non peptidiques n'avait été envisagée que pour potentialiser la  
25 neuritogénèse (Pradines et autres, 1995, J. Neurochem., 64, 1954-64) ; rien ne pouvait suggérer à l'homme de métier que des molécules non peptidiques étaient susceptibles d'induire la différenciation de monocytes en cellules dendritiques. Selon l'invention, et de façon tout à fait surprenante, on a trouvé qu'une catégorie de stéroïdes mime, à faible dose, l'effet facteur de croissance dendritogénique et l'effet des cytokines.  
30

La présente invention a, en conséquence, pour premier objet les nouveaux dérivés de stéroïdes susceptibles de procurer l'effet ci-dessus indiqué. Ces dérivés sont les composés de formule (I) :



formule dans laquelle le carbone en position 4 du squelette cholestérol porte des éléments  $T_1$ ,  $T_2$ , qui peuvent être indépendamment H ou  $\text{CH}_3$  avec  $\text{CH}_3$  en  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , le carbone en position 14 porte un élément  $T_3$ , qui peut être H ou un  $\text{CH}_3$  en  $\beta$ , l'une des liaisons entre les carbones 5 et 6, d'une part, et 7 et 8, d'autre part, peut être double alors que l'autre est simple, et dans laquelle :

- $Z$  représente, en position 5 ou 8, soit H soit OH, OH ne pouvant être porté que par un carbone qui ne porte pas de double liaison ;
- et  $R$  représente en position 6 ou 7, sur un carbone ne portant pas de double liaison, le substituant de formule  $-\text{Q}_0-\text{Q}_1$ ,

substituant dans la formule duquel

$-\text{Q}_0-$  représente le radical de formule (II) :

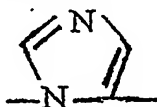
$-\text{X}-(\text{CH}_2)_{n_0} [ \text{Y}_1-(\text{CH}_2)_{n_1} ]_{p_1} [ \text{Y}_2-(\text{CH}_2)_{n_2} ]_{p_2} [ \text{Y}_3-(\text{CH}_2)_{n_3} ]_{p_3} [ \text{Y}_4-(\text{CH}_2)_{n_4} ]_{p_4} [ \text{Y}_5-(\text{CH}_2)_{n_5} ]_{p_5}$  (II)  
formule (II) dans laquelle :

- $p_1, p_2, p_3, p_4, p_5$  sont des nombres entiers égaux, indépendamment les uns des autres, à 0 ou 1,
- $n_0, n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$  sont des nombres entiers indépendants les uns des autres tels que :

$$1 \leq n_0 \leq 4$$

$$0 \leq n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 \leq 4$$

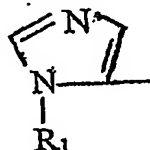
- $-\text{X}-$  représente  $-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NR}_3-$ , où  $\text{R}_3$  est H ou un radical alkyl en  $\text{C}_1-\text{C}_4$ , ou encore un hétérocycle



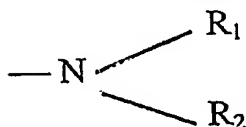
- $-\text{Y}_1-$ ,  $-\text{Y}_2-$ ,  $-\text{Y}_3-$ ,  $-\text{Y}_4-$ ,  $-\text{Y}_5-$  représentent, indépendamment les uns des autres,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{C}-$ ,  $-\text{NR}_3-$ , où  $\text{R}_3$  a la signification ci-dessus indiquée ;

et dans la formule duquel

- $Q_1$  représente un noyau indolique, un noyau morpholinique ou thiomorpholinique rattaché par son atome d'azote, un hétérocycle



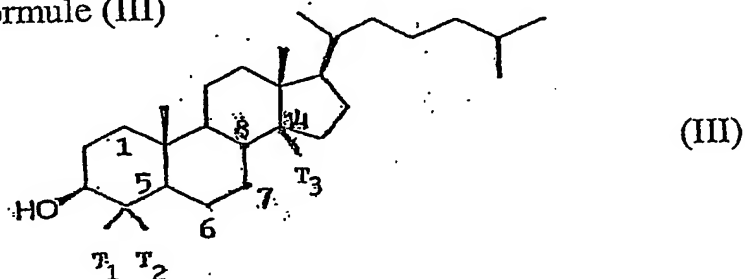
où  $R_1$  représente H,  $COCH_3$ , un radical alkyl en  $C_1-C_4$ , ou encore



où  $R_1$  a les significations ci-dessus indiquées et  $R_2$  représente H ou un radical alkyl en  $C_1-C_4$ ,  $R_1$  et  $R_2$  pouvant constituer ensemble un cycle pipéridinique, pyridinique, pipérazinique éventuellement substitué par un radical alkyl en  $C_1-C_4$ , ou encore un hétérocycle pyrrolique ou pyrrolidinique comportant un atome d'azote et 4 atomes de carbone.

La présente invention a aussi pour objet un procédé d'obtention des composés de formule (I) dans lequel :

- dans une première étape, on fait agir l'acide meta-chloroperoxybenzoïque, dissout dans un solvant A, sur un composé répondant à la formule (III)



formule dans laquelle le carbone en position 4 du squelette cholestérol porte des éléments  $T_1$ ,  $T_2$ , qui peuvent être indépendamment H ou  $CH_3$  avec  $CH_3$  en  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , le carbone en position 14 porte un élément  $T_3$ , qui peut être H ou un  $CH_3$  en  $\beta$ , l'une au moins des liaisons entre les carbones 5 et 6, d'une part, et 7 et 8, d'autre part, est double, le composé de formule III étant dissous dans un solvant B miscible au solvant A,

- dans une deuxième étape, on fait agir sur le composé époxy obtenu par la première étape, dissous dans un solvant C en présence d'un activateur D, une amine de formule  $Q_0Q_1$ ,  $Q_0$  et  $Q_1$  ayant les

significations indiquées dans la revendication 1, dissoute dans un solvant E miscible au solvant C.

Parmi les composés de formule (I) préférés, il faut citer :

- le cholestane-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[1-N1-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine] ;
- le cholestane-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[N,N'-b-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine] ;
- le cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[1-N1-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine] ;
- le cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[N,N'-b-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine] ;
- le cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[2 éthylamino-(3H-imidazol-4-yl)] ;
- le cholestan-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[2 éthylamino-(3H-imidazol-4-yl)] ;
- le cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-(4-Amino-butylamine) ;
- le cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-{2-[2-(2-amino-éthoxy)-éthoxy]-éthylamine} ;
- le cholestan-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[4-(2-amino-éthyl)-imidazol-1-yl] ;
- le cholestan-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-({1H-imidazol-4-yl}-éthyl)-acétamide.

On a constaté que l'utilisation des composés de formule (I) à des doses nanomolaires induit la production de vacuoles sécrétoires dans différentes lignes cellulaires tumorales, ce qui, selon l'état de la technique, est généralement associé à une dendritogénèse, et dans des lignées cellulaires immortalisées telles que les NIH-3T3 ou les COS-7.

L'invention a donc aussi pour objet un médicament utilisable pour la production de vacuoles sécrétoires dans des cellules tumorales, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins un composé de formule (I).

L'invention a aussi pour objet un médicament qui est utilisable pour augmenter la dendritogénèse en vue de l'activation du système immunitaire, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins un composé de formule (I). Dans un mode avantageux de mise en œuvre, ces médicaments sont utilisables pour la régression des tumeurs cancéreuses chez les mammifères et avantageusement administrables par injection ; dans un tel cas, ils peuvent être utilisés à des doses allant de 8,5 ng/g d'organisme traité à 1,7  $\mu$ g/g d'organisme traité, l'injection s'effectuant, de préférence, à proximité de la tumeur à traiter.



L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle comporte, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, un médicament tel que ci-dessus défini.

5 L'induction de la production de vacuoles a été observée dans différentes lignées cellulaires tumorales et notamment les cellules A549, U937, MCF-7, HT29, PC12 et B16.

On va donner ci-après plusieurs exemples de préparation des composés selon l'invention. En premier lieu, on va fournir les détails  
10 relatifs au procédé commun utilisé pour la préparation des différents composés donnés comme exemples : ce procédé est réalisé en deux étapes, la première consistant en l'obtention d'un époxy-stérol et la deuxième consistant à transformer ledit époxy-stérol en stérol aminé. Les exemples 1 et 2 décrivent chacun la première étape en vue de  
15 l'obtention de deux séries différentes de 5,6- $\alpha$ -époxy-stérols. L'exemple 3 décrit la deuxième étape utilisant les produits intermédiaires des exemples 1 et 2 pour les faire réagir avec une amine ; les exemples 4 à 13 décrivent les produits obtenus selon l'exemple 3 avec différentes amines.

20 Exemple 1 : préparation du 5,6- $\alpha$ -époxycholestan-3- $\beta$ -ol :

De l'acide méta-chloro-peroxybenzoïque (0,73 g, 4,25 mmol, pureté de 70-75 % en poids) est dissous dans du chlorure de méthylène (10 ml) et ajouté goutte à goutte à un mélange de cholestérol (1 g, 2,5 mmol) dissous dans du chlorure de méthylène (25 ml). L'agitation  
25 est maintenue toute la nuit. Le mélange réactionnel est lavé avec une solution aqueuse de sulfite de sodium (10 % en poids) et d'hydrogénocarbonate de sodium (5 % en poids) et une solution saturée d'un mélange de chlorure de sodium et de chlorure de potassium. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium anhydre.  
30 L'évaporation sous vide du solvant organique permet l'obtention de 0,7 g d'aiguilles blanches (rendement 69,5 %). La proportion des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  de l'époxyde a été déterminée par RMN du proton à 200 MHz : on trouve 78 %  $\alpha$  époxyde, 22 %  $\beta$  époxyde (RMN du proton 1H :  $\delta$  2,89 (d, 1H, J=4,37 Hz, H-6) ; 3,04 (d, J=2,43 Hz, H-6) ; 3,91 (m, 1H, H-3) ;  
35 SM DCI/NH<sub>3</sub> MH<sup>+</sup> 403. Les isomères  $\alpha$  et  $\beta$  ont été séparés par chromatographie liquide sur silice (toluène/éther éthylique, 85/15).

L'isomère  $\alpha$  a pour point de fusion  $pf=141-142^{\circ}C$  ; l'isomère  $\beta$  a pour point de fusion  $pf= 131-132^{\circ}C$ . Pour compléter la caractérisation, on a effectué une chromatographie sur couche mince (acétate d'éthyle) ; on a obtenu :  $R_f = 0,69$  (couleur marron après révélation avec le mélange  
5 acide sulfurique-méthanol).

Exemple 2 : préparation du 5,6- $\alpha$ -époxycholest-7-en-3 $\beta$ -ol :

Du 7-déshydrocholestérol (Acros, 1 g, 2,6 mmol) et du carbonate de sodium (0,55 g, 5,2 mmol) sont dissous dans un mélange de chlorure de méthylène (25 ml) et d'eau (25 ml). De l'acide méta  
10 chloroperoxybenzoïque (0,73 g, 4,25 mmol, pureté 70-75 % en poids) est dissous dans du chlorure de méthylène (10 ml) et ajouté goutte à goutte sur le mélange maintenu sous une agitation vigoureuse. Après 10 minutes d'agitation, la phase est récupérée puis lavée avec une solution aqueuse constituée d'une solution aqueuse de sulfite de sodium  
15 (10 % en poids), d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (5 % en poids) et d'une solution saturée d'un mélange de chlorure de sodium et de chlorure de potassium. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium anhydre. L'évaporation du solvant et la recristallisation du produit dans l'acétone permet l'obtention de 0,7 g d'aiguilles blanches  
20 (rendement 70 %). La structure a été confirmée par RMN du proton :  $\delta$  0,52 (s,3H,H-19) ; 2,986 (d,1H,J=4,1 Hz, H-6) ; 3,91 (m,1H,H-3) ; SM DCI/ $NH_3$   $MH^+$  401. On a déterminé le point de fusion  $pf = 144-146^{\circ}C$ .

Exemple 3 : Synthèse des stérols aminés à partir des époxy-  
25 stérols:

Du perchlorate de lithium (0,75 mmol) et une amine sous sa forme basique (1 mmol) sont dissous dans de l'éthanol anhydre (1 ml) et ajoutés sous flux d'argon à une solution éthanolique (3 ml) d'un époxy-  
30 stérol obtenu selon l'un des exemples 1 ou 2 (100 mg, 0,25 mmol). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation et à reflux, pendant 6 jours dans le cas de l'exemple 1 et pendant 3 jours en absence de lumière et à température ambiante dans le cas de l'exemple 2. L'avancée de la réaction est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) dans les conditions adaptées aux différentes amines. Le solvant est  
35 éliminé par évaporation et le résidu est lavé avec de l'éther éthylique (5 x 3 ml) et de l'hexane (5 x 20 ml). Le résidu est solubilisé dans l'eau

et acidifié avec HCl 2M (2 ml). La solution est pré-purifiée sur cartouche de silice greffée (sep-pack cartridge RP C18, 500 mg, Waters), l'excès de polyamine est éliminé par passage d'eau sur la cartouche (5 ml). Le produit est élué avec un mélange CH<sub>2</sub>CN 1/H<sub>2</sub>O 1 (5 ml). Le produit est purifié par HPLC en phase inversée grâce à un gradient linéaire d'un mélange de départ H<sub>2</sub>O 95/CH<sub>3</sub>CN 5/TFA 0,1 % jusqu'à un mélange CH<sub>3</sub>CN 95/H<sub>2</sub>O 5/TFA 0,1 atteint en 60 minutes (débit = 1 ml/min ;  $\lambda$  = 210 nm). La fraction d'intérêt a été repurifiée dans des conditions isocratiques en utilisant une phase mobile composée d'un mélange (CH<sub>3</sub>CN 95/H<sub>2</sub>O 5/TFA 0,1) 44 %/(H<sub>2</sub>O 95/CH<sub>3</sub>CN 5/TFA 0,1 %) 56 % (débit = 1 ml/min ;  $\lambda$  = 210 nm).

Exemple 4 : Préparation du Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[1-N1-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine]

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la N1-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par chromatographie sur couche mince (CCM) (alcool isopropylique/ammoniaque 28 % / H<sub>2</sub>O 6/3/1) : R<sub>f</sub> = 0,62.

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : MH<sup>+</sup> : 548.

Exemple 5 : Préparation du Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[N,N'-bis-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine]

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la N,N'-bis-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (alcool isopropylique/ammoniaque 28 % / H<sub>2</sub>O 6/3/1) : R<sub>f</sub> = 0,37.

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : MH<sup>+</sup> : 605,5.

Exemple 6 : Préparation du Cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[1-N1-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine]

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la N1-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (alcool isopropylique/ammoniaque 28 % / H<sub>2</sub>O 6/3/1) : R<sub>f</sub> = 0,62.

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : MH<sup>+</sup> : 546.

Exemple 7 : Préparation du Cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[N,N'-bis-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamino]

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la N,N'-bis-(3-amino-propyl)-butane-1,4-diamine.

5 Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (alcool isopropylique/ammoniaque 28 % / H<sub>2</sub>O 6/3/1) : R<sub>f</sub> = 0,37.

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : MH<sup>+</sup> : 603,5.

10 Exemple 8 : Préparation du Cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[2 éthylamino-(3*H*-imidazol-4-yl)]

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la 2-(3*H*-imidazol-4-yl)-éthylamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (MeOH) : R<sub>f</sub> = 0,38.

15 On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : MH<sup>+</sup> : 512,5 ; m/z : 365,3.

Exemple 9 : Préparation du Cholestan-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[2 éthylamino-(3*H*-imidazol-4-yl)]

20 Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la 2-(3*H*-imidazol-4-yl)-éthylamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (MeOH) : R<sub>f</sub> = 0,38.

On a aussi effectué une chromatographie à haute performance (HPLC) sur un appareil Perkin-Elmer 200 équipé d'une colonne  
25 "Ultrasep ES100RP18" (particules de 6  $\mu$ m), de 250 mm de longueur et 8 mm de diamètre, fabriquée par la société "Bishoff".

HPLCprofil : 44 % B  $\lambda$  = 220 nm tr = 44-50 min

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : m/z : 514,5 (MH<sup>+</sup>).

30 Exemple 10 : Cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-(4-amino butylamine)

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la 4-amino-butylamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (MeOH/ammoniaque 28 % : 8/2) : R<sub>f</sub> = 0,55.

35 On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : m/z : 489 (MH<sup>+</sup>).

Exemple 11 : Cholest-7-ene-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-{2-[2-(2-amino-éthoxy)-éthoxy]-éthylamine}

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la 2-{2-[2-(2-amino-éthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-éthylamine.

5 Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (MeOH/ammoniaque 28 % / 8/2) : Rf = 0,8.

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : m/z : 549 (MH+).

10 Exemple 12 : Cholestan-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-[4-(2-amino-éthyl)-imidazol-1-yl]

Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la 2-(3H-imidazol-4-yl)éthylamine.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (MeOH/ammoniaque 28 %, 8/2) : Rf = 0,72.

15 On a aussi effectué une HPLC sur un appareil Perkin-Elmer 200 équipé d'une colonne "Ultrasep ES100RP18" (particules de 6  $\mu$ m), de 250 mm de longueur et 8 mm de diamètre, fabriquée par la société "Bishoff".

HPLC profil : 44 %B  $\lambda$  = 220 nm tr = 44-50 min

20 On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : m/z : 514,5 (MH+).

Exemple 13 : Préparation du Cholestan-3 $\beta$ , 5 $\beta$  diol 6 $\alpha$ -N-({1H-imidazol-4-yl}-éthyl)-acétamide

25 Dans l'exemple 3, on utilise comme amine la N-[2-(3H-imidazol-4-yl)-éthyl]-acétamide.

Le produit obtenu est caractérisé spécifiquement par CCM (MeOH/acétate d'éthyle, 1/1) : Rf = 0,5.

30 On a aussi effectué une HPLC sur un appareil Perkin-Elmer 200 équipé d'une colonne "Ultrasep ES100RP18" (particules de 6  $\mu$ m), de 250 mm de longueur et 8 mm de diamètre, fabriquée par la société "Bishoff".

HPLC profil : 44 %B  $\lambda$  = 220 nm tr = 44-50 min

On a enfin effectué une spectroscopie de masse (electrospray) : m/z : 557 (MH+).

Les exemples 14 et suivants sont relatifs à la mise en œuvre des composés selon l'invention.

Exemple 14 : différenciation en cellules dendritiques

1) Sur des monocytes de rate de souris C57/B16

5 Des souris de 5 semaines sont sacrifiées par dislocation cervicale. Elles sont ensuite disséquées. Les rates sont prélevées dans des conditions stériles, puis déposées dans une solution froide (4°C) contenant du milieu de culture sans sérum additionné d'antibiotiques (streptomycine, pénicilline). Les rates sont broyées sous une hotte  
10 stérile, puis filtrées sur un filtre de 100 µm. L'éluat est récupéré puis centrifugé à 1000 tours/mn durant 5 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans une solution tampon phosphate salin (TPS) contenant de la collagénase qui a pour but de lyser les hématies. La suspension est centrifugée à 1000 tours/mn puis les cellules sont  
15 resuspendues dans du TPS. L'opération de lavage est effectuée deux fois. La dernière resuspension est réalisée dans du milieu de culture complet, les cellules sont comptées et sont réparties dans des boîtes de six puits à une densité de 40 000 cellules/ml. Quatre heures après, les cellules adhérentes sont lavées vigoureusement par du TPS afin  
20 d'éliminer les cellules qui auraient pu rester accrochées aux cellules adhérentes ou à la boîte de culture.

La figure 1 montre les importantes modifications morphologiques sur les monocytes de souris obtenus comme ci-dessus indiqué, la transformation aboutissant à des cellules dendritiques. La transformation  
25 a été obtenue avec une dose de 1nM, la photographie ayant été prise 36 heures après le début d'action du produit. Le produit testé est celui de l'exemple 9. On observe l'apparition de prolongements cellulaires, qui sont l'une des principales caractéristiques de cellules dendritiques activées.

30 Dans le même temps de traitement des cellules, on a constaté que l'IL-4 et le GM-CSF sont inefficaces ; on a constaté également que sont inefficaces les composés, qui ont servi à la synthèse du composé de formule (I) testé, à savoir le cholestérol, le dérivé époxy-cholestérol et l'amine.

35 Des résultats analogues ont été obtenus avec les composés des exemples 8, 10 et 11.

## 2) Sur des cellules PC12

Les cellules PC12 ont été cultivées à une densité initiale de  $1.5 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 complémenté par 10 % de sérum de veau fœtal et 5 % de sérum de cheval. Le fond des boîtes de culture est traité par une solution de poly-lysine à 0,1 % en poids ou de collagène afin de provoquer l'adhérence des cellules. Les cellules surnageantes sont éliminées après 12 heures puis traitées avec ou sans Nerve growth factor (NGF) à 10 ng/ml, avec ou sans le composé de l'exemple 6 ou de l'exemple 7. Les cellules sont observées par microscopie de contraste de phase.

Les cellules PC12 "contrôle" ont été traitées avec le véhicule-solvant utilisé pour les composés testés à savoir (eau + 0,1 % en poids d'éthanol) : ces cellules "contrôle" apparaissent rondes et n'évoluent pas sur le plan morphologique au cours du temps.

Les cellules PC12 traitées au moyen du composé de l'exemple 6 ou de l'exemple 7 ont été traitées à une dose de 10 nM, le temps d'action du composé étant de 36 heures.

Les cellules PC12 traitées par le composé de l'exemple 6 changent rapidement de morphologie ; elles deviennent ovoïdes après 2 à 4 heures de traitement ; puis on observe l'apparition d'excroissances qui évoluent progressivement vers la formation de dendrites (voir figure 2). On constate que ces cellules PC12 sont bi-polarisées.

Après 4 heures de traitement des cellules PC12 avec le composé de l'exemple 6, on observe l'apparition de foyers d'adhérence de cellules dans les boîtes de culture. Ces foyers sont 4 à 6 fois plus nombreux que dans le cas de cellules traitées avec du NGF utilisé à des doses de 10 ng/ml. Le composé testé provoque la pousse de dendrites sur les PC12 dans des conditions similaires à celles précédemment indiquées pour le traitement avec le composé de l'exemple 6.

## 3) Sur des cellules leucémiques myéloïdes humaines U-937

La figure 3 représente l'induction de la différenciation des cellules U-937 en cellules dendritiques au moyen du composé de l'exemple 9.

La photographie 1 représente les cellules après un traitement par 10 ng/ml de phorbol-myristyl-acétate (PMA) de manière à les faire adhérer sur le fond des boîtes de culture. La photographie 2 permet, après 2 jours de traitement avec 1 nM du composé de l'exemple 9,

d'observer l'apparition de cellules dendritiques (CD). La photographie 3 montre, après 5 jours de traitement, l'augmentation de la taille des dendrites (jusqu'à 100  $\mu$ m) et la formation d'un grand nombre de rosettes (R) constituées d'un conglomerat de cellules entrelacées les unes avec les autres.

Exemple 15 : apparition d'antigènes de surface caractéristique de l'état de différenciation des CD.

L'étude a été menée sur des CD provenant de splénocytes de souris C57/B16, de PBMC humains et de cellules leucémiques myéloïdes U937. Les cellules provenant de splénocytes de souris C57BL/6 ont été préparées comme indiqué à l'exemple 14.1.

Les phénotypes sont analysés par cytométrie de flux sur un "FAC Scan flow" (Beckton Dickinson, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) en utilisant des anticorps conjugués au FITC (HLA-DR, CD-80, LAMP-II, Récepteur au mannose) et des anticorps conjugués à la Phycoerythrine (anti-CD-83, CD-86 et CD-40 provenant tous de "BD Bioscience").

Pour le composé de l'exemple 9, les résultats sont fournis dans le tableau ci-dessous :

Phénotype des cellules dendritiques stimulées par le composé de l'exemple 9

Phénotype	CD dérivées de monocytes de souris C57/B16	CD dérivées de cellules U-937	CD dérivées de monocytes humains
CMH de Classe I	+++	+++	+++
CMH de Classe II	+++	+++	+++
CD 80	+++	+++	+++
CD 40	+++	+++	+++
CD 86	+	+	+
Récepteur au Mannose	+	+	+
LAMP-II	+	+	+
CD 83	ND	+	+
ND = non déterminé			



Exemple 16 : production d'IL-12p70 et d'IL-10 par les cellules dendritiques

Les surnageants de cultures sont congelés à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce qu'ils soient testés pour la présence des cytokines. La présence de IL-12p70 et IL-10 est mesurée à l'aide de kits ELISA obtenus par "Endogen" (Woburn, MA, USA).

La figure 4 représente la production de cytokines par les cellules U-937 traitées par le composé de l'exemple 9. On constate que le traitement stimule la production de la sous-unité p70 de l'IL-12 dès 36 heures après le début du traitement. Ce phénomène se poursuit pendant les deux semaines de traitement. Ce même traitement ne stimule pas la transcription d'IL-10 pour des traitements qui s'étendent sur une durée de deux semaines : ce résultat est particulièrement avantageux dès lors que l'on sait que IL-10 a des propriétés immuno-suppressives, qui bloquent la différenciation des cellules dendritiques et que le couple (IL-4 + GM-CSF) stimule la production d'IL-10.

Exemple 17 : prolifération des lymphocytes T

Des monocytes de souris C57BL/6 ont été prélevés comme indiqué à l'exemple 14.1. Les cellules dendritiques ont été obtenues comme indiqué à l'exemple 9. Après transformation en CD par le composé testé, les cellules sont traitées par un antimitotique (mitomycin C à  $0,0006\text{ mg/ml}$ ) et incubées pendant 30 mn. à  $37^{\circ}\text{C}$ , afin de bloquer la synthèse d'ADN dans les CD. Après ce traitement, deux lavages des cellules sont réalisés avec du milieu RPMI 1640 complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal.

Des rates de souris BALB/c ont également été prélevées et traitées comme cela a été décrit pour la préparation des monocytes de souris C57BL/6. Les cellules non-adhérentes, qui contiennent les lymphocytes T, sont récupérées et ajoutées aux cellules dendritiques de souris C57BL/6. Au quatrième jour de mise en présence des cellules, on ajoute de la thymidine tritiée. Après 18 heures d'incubation, les cellules sont lysées avec de l'alcool absolu. Le précipité est suspendu dans de l'eau puis filtré sur un filtre de cellulose. L'incorporation de thymidine est mesurée par comptage à scintillation (Pakard Instrument, Meriden CT, USA).

La figure 5 représente l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques produites sous l'effet du composé de l'exemple 9. Les monocytes adhérents provenant de rates de souris obtenues selon l'exemple 14.1 ont été traités par le composé susmentionné à des doses variables. Les cellules dendritiques ainsi obtenues ont été mises en présence des lymphocytes T provenant de rates de souris BALB/c. La prolifération des lymphocytes est mesurée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN.

On constate que le composé testé induit une stimulation de la prolifération des lymphocytes T d'un facteur 5. Si l'on effectue le traitement des mêmes cellules par le couple (IL-4/GM-CSF) suivi d'un traitement par le  $\text{TNF}\alpha$ , l'effet de prolifération n'est observé qu'à un niveau beaucoup plus faible puisque cet effet correspond à un facteur 1,4.

Exemple 18 : prolifération de cellules d'adénocarcinome mammaire de souris (TS/A (H-2<sup>d</sup>)) en culture

La lignée tumorale de souris TS/A (H-2<sup>d</sup>) est une lignée cellulaire d'un adénocarcinome mammaire spontané de souris syngénique des souris BALB/c. Elles sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 contrôlé sans micoplasme supplémenté par du sérum de veau fœtal contrôlé sans endotoxine (GIRCO-BRIO, 2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, des acides aminés essentiels et du pyruvate de sodium.

La figure 6 montre la cytotoxicité sur TS/A in vitro : les cellules tumorales ont été traitées par des doses variables du composé de l'exemple 9. La cytotoxicité apparaît pour des doses de 50 µM. Les doses choisies pour effectuer les tests sur les tumeurs implantées sur les souris BALB/C étaient des doses de 5 nM et 1 µM pour lesquelles aucune toxicité n'est observée quel que soit le temps d'incubation avec les cellules.

Exemple 19 : Tests de croissance sur tumeurs implantées sur les souris C57BL/6

Les tumeurs sont implantées de la façon suivante :  $1.10^6$  cellules de TS/A sont inoculées par injection intradermique dans le flanc droit de l'abdomen de souris BALB/c âgées de 5-6 semaines (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle).

La molécule testée est celle qui correspond à l'exemple 9 ; elle est injectée au troisième jour en intradermique à proximité de la tumeur ; le résultat est représenté sur la figure 7.

Dans cette expérimentation, les cellules de type TS/A sont  
5 implantées par injection sous-cutanée à des souris C57/B16 en présence ou en absence du composé testé. En l'absence du composé, les tumeurs apparaissent dès quatre jours et poussent durant une période de trente jours. Il apparaît, par rapport aux souris témoins, un effet de ralentissement pour une dose de composé testé de 8,5 ng/g de souris. A  
10 la dose de 1,7 µg/g de souris, aucune tumeur n'est détectable sur les souris. Ceci illustre l'extrême efficacité du traitement. Les analyses d'anatomo-pathologie montrent qu'aucune trace de nécrose n'est observable au niveau de la zone d'injection du composé testé. Pour les  
15 souris traitées par le composé testé, à une dose de 1,7 µg/g, qu'il y ait eu ou non une implantation de tumeur, on observe une hyperplasie du système lymphoïde périphérique significatif d'une activation du système immunitaire.

Exemple 20 : Induction de la production de vacuoles dans la lignée cellulaire tumorale A 549

20 Des cellules A549 ont été traitées avec 100 nM de composé selon l'exemple 9 pendant 12 heures.

Les cellules A549 ont été obtenues de l'American Tissue Culture Collection (ATCC) ; elles ont été ensemencées à une densité de 50.000  
25 cellules par puits dans des plaques de 12 puits et ont été cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal. Pour effectuer le traitement avec le composé selon l'invention, les cellules sont incubées avec ledit composé (ou avec un produit contrôle) pendant  
30 48 heures. Les cellules sont alors observées en microscopie de contraste de phase toutes les quatre heures pour surveiller la formation de vacuoles puis elles sont fixées avec une solution de 0,4 % de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate salin (TPS) à pH 7.4.

Le résultat est représenté sur la figure 8 (microscopie en contraste de phase). La photographie A montre les cellules avant traitement et la  
35 photographie B après traitement ; sur la photographie C, les cellules ont été traitées avec le véhicule solvant ; et sur la photographie D, on

constate que le traitement avec le composé selon l'invention conduit à une apparition massive de vacuoles.

Pour obtenir la photographie D ci-dessus indiquée, on a procédé comme suit : après le traitement des cellules, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées à l'aide de TPS à pH 7.4. Les cellules sont incubées pendant 10 mn par des solutions 1  $\mu$ M de monodansyl cadavérine (MDC). Elles sont ensuite rincées abondamment par une solution de TPS à 4°C. Une goutte de solution de "Vectashield" (Vector laboratoires, CA) est ajoutée avant le montage entre lame et lamelle : les cellules sont ensuite observées rapidement au microscope et photographiées. La photographie D de la figure 8 montre de nombreuses vacuoles fluorescentes dans les cellules.

On constate donc que le composé testé induit une production massive de vacuoles cytoplasmiques dans la lignée tumorale humaine A549. L'effet constaté est dose-dépendant et il apparaît six heures après le traitement ; il atteint un maximum douze heures après le traitement.

On a constaté que le composé de l'exemple 8 montrait également un effet analogue. En outre, un phénomène analogue a été observé sur les cellules U-937, PC-12, MCF-7, HELA, COS-7, HEK-293, HEK-293T, NIH-3T3, HT-29 et CHO obtenues et traitées comme indiqué ci-dessus pour les cellules A 549.

Lorsque le traitement des cellules est stoppé en remplaçant le milieu de croissance par un milieu frais, les vacuoles disparaissent : ceci montre que l'effet du composé selon l'invention est réversible.

Les cellules A549 traitées comme indiqué ci-dessus avec le composé selon l'exemple 9 ont aussi été examinées en microscopie électronique. Pour examiner ces A549 en microscopie électronique, on les fixe à l'aide d'une solution de TPS contenant 3 % de glutaraldéhyde, on les prend dans de la résine (EPON) et enfin on les coupe en fines lamelles à l'ultra-microtome. Ces lamelles sont alors déposées sur des grilles en cuivre de 200 mesh puis examinées en microscopie électronique. Les résultats sont présentés sur la figure 11. Sur la figure 11.1, on voit les cellules "contrôle" (grossissement 6.000) ; sur la figure 11.2 on voit les cellules traitées par le composé de l'exemple 9 (grossissement 4.000) ; sur la figure 11.3, on voit un agrandissement des vésicules détectables sur la figure 11.2 (grossissement 25.000) ; sur la

figure 11.4, on voit un détail du contenu d'une vacuole intracytoplasmique (grossissement 72.000). Sur cette figure 11, les lettres utilisées ont les significations suivantes : N = noyau ; C= cytoplasme ; M = mitochondries ; Vi = vésicules intracytoplasmiques ;  
 5 Ve = vésicules extracellulaires ; CML = corps multilamellaire.

L'analyse détaillée des photographies de la figure 11 permet les observations suivantes : on observe sur la figure 11.1 une cellule ayant un noyau volumineux centré, entouré par le cytoplasme ; à la surface de la cellule, on observe de petits prolongements, qui sont des villi. Sur la  
 10 photographie 11.2, on voit la cellule après qu'elle ait subi un traitement par le composé selon l'invention ; elle a adopté une morphologie fusiforme ; les villi sont concentrés sur une face de la cellule (dans le quart droit en bas sur la figure 11.2) où apparaissent en surface de nombreuses vacuoles ; on observe également de nombreuses vacuoles et  
 15 mitochondries dans le cytoplasme. Sur la photographie 11.3, on observe de nombreuses mitochondries ainsi que des vacuoles, qui contiennent des corps sombres et qui sont entourées de fibres de cytosquelette ; sur cette vue, deux types de vacuoles sont observables : des vacuoles intracytoplasmiques (Vi) et des vacuoles extracytoplasmiques (Ve). Sur  
 20 la figure 11.4, on voit un détail d'une structure contenue dans les vacuoles intracytoplasmiques : il s'agit d'un corps multilamellaire caractéristique des cellules pulmonaires produisant des protéines de type surfactant B.

#### Exemple 21 : Test de survie de cellules PC12

25 Des cellules PC12 ont été traitées comme indiqué à l'exemple 14.2. Dans le cas du présent exemples, elles sont traitées par des doses croissantes d'un composé selon l'invention utilisé à 100 nM ; elles sont maintenues dans des boîtes de culture pendant trois semaines. Le nombre de cellules vivantes est mesuré tous les deux jours. Le composé  
 30 testé est ajouté tous les deux jours pendant les six premiers jours du traitement.

Ce test a été effectué avec le composé de l'exemple 6 et le composé de l'exemple 7. Les cellules PC12 ont été incubées à 37°C avec  
 35 chacun des composés testés et avec 10 ng/ml de NGF : ces substances ont été rajoutées au milieu de culture lors de l'ensemencement. les résultats sont exprimés en pourcentages moyens de survie des cellules

PC12 pour trois expériences indépendantes : ils sont représentés sur la figure 9.

Les cellules PC12 ainsi traitées sont maintenues en culture après avoir subi la pousse dendritique dont l'existence a été établie par l'exemple 14.2. On constate que la survie de ces cellules est, par rapport à l'utilisation du NGF, considérablement augmentée lorsqu'on utilise les composés selon l'invention.

#### Exemple 22 : Survie de moto-neurones

On a extrait des neurones de souris et on les a maintenus en culture selon la méthode décrite par Duong et Coll., British Journal of Pharmacology, 1999, vol. 28, p. 1385-1392. Les cellules maintenues en culture ont été traitées par le véhicule-solvant utilisé (eau + diméthyl sulfoxyde 0,02 %), par un facteur neurotrophique (à savoir le BDNF, "Brain Derived Neurotrophic Factor") ou par un composé selon l'invention. On a utilisé des doses variables de composé afin d'évaluer les propriétés des composés selon l'invention sur les moto-neurones normaux. La méthodologie utilisée pour les cultures et le comptage des cellules survivantes est la même que celle définie à l'exemple 21 ; les moto-neurones purifiés ont été incubés à 37°C avec le véhicule-solvant ci-dessus indiqué, avec 10 ng/ml de BDNF ou avec le composé de l'exemple 6 ou de l'exemple 7. à une concentration de 100 nM. Les résultats sont représentés sur la figure 10.

On constate qu'en l'absence de traitement avec un composé selon l'invention ou avec le BDNF, les cellules disparaissent rapidement au bout de quelques jours. On constate que l'efficacité de l'un ou l'autre des composés selon l'invention qui ont été testés est supérieure à celle du BDNF : l'ajout d'un composé selon l'invention entraîne donc non seulement la pousse dendritique (comme établi par l'exemple 14), mais également la survie des cellules pendant une période de trois semaines.

#### Exemple 23 : squelette d'actine sur les cellules A549 traitées

Des cellules A549 ont été traitées par le composé de l'exemple 9 selon le protocole décrit en détail dans l'exemple 20 ; elles sontensemencées sur des lamelles de verre placées au fond de boîtes de culture à six puits (NUNC) à une densité de 50.000 cellules par puits dans un milieu nutritif de type RPMI 1640 complémenté à 10 % en sérum de veau fœtal. Les cellules sont alors fixées par une solution à 3

% de paraformaldéhyde et elles sont perméabilisées par une solution détergente contenant 0,1 % de "Triton-X-100" dans du TPS. On a observé le squelette d'actine des cellules traitées en marquant les cellules avec la phalloïdine-FITC.

5 Le résultat est présenté sur la figure 12 : la photographie 1 de la figure 12 montre les cellules A549 témoin : le cytosquelette d'actine enserme les cellules de façon régulière. La photographie 2 de la figure 12 montre l'apparition de vésicules réfringentes, qui sont entourées d'actine ; de telles vésicules sont également apparentes à l'extérieur de la  
10 cellule : on pense que l'actine intervient comme moteur lors de la sécrétion des vacuoles d'exocytose mises en évidence dans l'exemple 20.

Sur la figure 13, on a présenté l'observation du squelette de tubuline sur les cellules A549 en microscopie de fluorescence. La photographie 1 montre une cellule témoin non traitée et la photographie  
15 2 montre une cellule traitée selon le processus donné en détail dans l'exemple 20. Le marquage des cellules A549 se fait ici avec un anticorps anti-tubuline  $\gamma$  avec révélation avec un anti-corps anti-IgG-FITC.

Sur la photographie 1, on observe un réseau filamentueux régulier.  
20 Sur la photographie 2, on observe la présence de vacuoles intracytoplasmiques, qui ne sont pas entourées de tubuline  $\gamma$  (apparition de nombreux trous qui délimitent la présence de ces vacuoles).

Les observations combinées des figures 12 et 13 montrent que les fibres de cytosquelette observables en microscopie électronique dans les  
25 cellules A549 traitées contiennent des fibres d'actine.

Exemple 24 : induction de la production de vacuoles dans la lignée cellulaire tumorale U937

Des cellules U937 ont été traitées avec 10 nM du composé selon l'exemple 9 pendant 24 heures. Les modalités du traitement sont celles  
30 qui ont été exposées en détail à l'exemple 20.

Le résultat est représenté sur la figure 14. Sur cette figure, la photographie 1 correspond à une cellule "témoin" (grossissement 6.000). La photographie 2 correspond à une cellule traitée par le composé de l'exemple 9 (grossissement 4.000) : on constate que la cellule a changé  
35 de forme et fait apparaître de nombreuses vacuoles intracytoplasmiques (repérées Vi sur la photographie). Les significations des lettres symbole

sur la figure 14 sont les mêmes que celles qui ont été utilisées pour la figure 11. Sur la photographie 3 (grossissement 25.000) on constate la présence d'un réseau membranaire extrêmement développé ; on distingue de nombreux organites cellulaires (nombreuses mitochondries 5 témoignant d'une activité intense) ; on distingue également des corps multi-vésiculaires (CMV), dont le détail apparaît sur la photographie 4 de la figure 14, cette photographie représentant un CMV en cours de sécrétion à l'extérieur de la cellule (grossissement 72.000).

Exemple 25 : sur-expression d'un récepteur membranaire dans la 10 lignée cellulaire tumorale U937

Des cellules U937 ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640. On génère un plasmide codant un récepteur membranaire RCPG-MA qui appartient à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G et qui contient une étiquette HA. Les cellules U937 exprimant les 15 récepteurs sont générées par transfection en utilisant le réactif "lipofectamine" selon les instructions du fabricant.

48 heures après la transfection, on a traité les cellules transfectées par 10 nM de composé selon l'exemple 9 pendant 12 heures.

La figure 15 présente deux photographies d'immunofluorescence 20 de cellules U937 qui expriment le RCPG-HA et qui ont subi un traitement par le composé de l'exemple 9. Ces cellules ont été fixées pour être examinées en microscopie de fluorescence. La présence du récepteur est révélée par incubation en présence d'un anticorps anti-HA suivie d'une incubation avec un anticorps anti-IgG-FITC. Les 25 photographies de la figure 15 montrent l'expression d'un récepteur membranaire de type RCPG dans les cellules qui ont été traitées par le composé selon l'invention, alors qu'en l'absence de traitement l'immuno-détection est difficilement réalisée.

Cette expérience montre que les cellules transfectées peuvent 30 produire massivement un récepteur membranaire dans les vacuoles intracytoplasmiques.

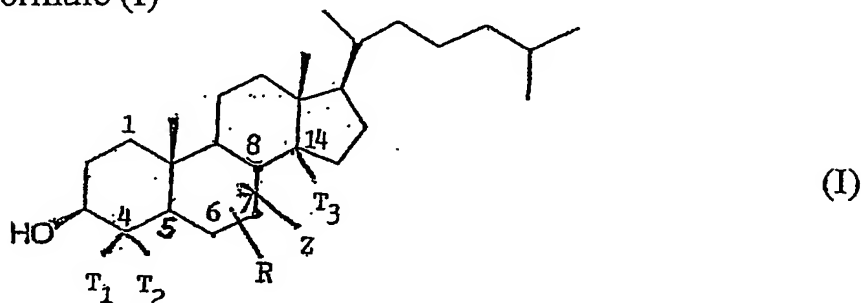
Les exemples 14 et suivants, qui ont été ci-dessus exposés, montrent que les types cellulaires soumis aux expérimentations produisent tous des vacuoles lorsqu'ils sont traités avec l'un des 35 composés selon l'invention : selon les cas, il peut s'agir de vacuoles multi-lamellaires et/ou multi-vésiculaires. On constate que le traitement



par un composé selon l'invention permet de constater dans les cellules traitées une activité de re-différentiation des cellules tumorales vers un phénotype normal.

## REVENDICATIONS

1. Composé dérivé de stérol, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I)

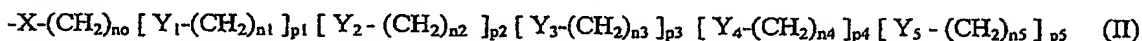


formule dans laquelle le carbone en position 4 du squelette cholestérol porte des éléments  $T_1$ ,  $T_2$ , qui peuvent être indépendamment H ou  $\text{CH}_3$  avec  $\text{CH}_3$  en  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , le carbone en position 14 porte un élément  $T_3$ , qui peut être H ou un  $\text{CH}_3$  en  $\beta$ , l'une des liaisons entre les carbones 5 et 6, d'une part, et 7 et 8, d'autre part, peut être double alors que l'autre est simple, et dans laquelle :

- Z représente, en position 5 ou 8, soit H soit OH, OH ne pouvant être porté que par un carbone qui ne porte pas de double liaison ;
- et R représente en position 6 ou 7, sur un carbone ne portant pas de double liaison, le substituant de formule  $-\text{Q}_0-\text{Q}_1$ ,

substituant dans la formule duquel

$-\text{Q}_0-$  représente le radical de formule (II) :



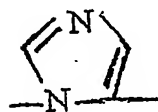
formule (II) dans laquelle :

- $p_1, p_2, p_3, p_4, p_5$  sont des nombres entiers égaux, indépendamment les uns des autres, à 0 ou 1,
- $n_0, n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$  sont des nombres entiers indépendants les uns des autres tels que :

$$1 \leq n_0 \leq 4$$

$$0 \leq n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 \leq 4$$

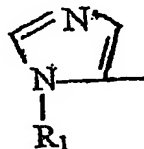
- $-\text{X}-$  représente  $-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NR}_3-$ , où  $\text{R}_3$  est H ou un radical alkyl en  $\text{C}_1-\text{C}_4$ , ou encore un hétérocycle :



•  $-Y_1-$ ,  $-Y_2-$ ,  $-Y_3-$ ,  $-Y_4-$ ,  $-Y_5-$  représentent, indépendamment les uns des autres,  $-S-$ ,  $-O-$ ,  $-C-$ ,  $-NR_3-$ , où  $R_3$  a la signification ci-dessus indiquée ;

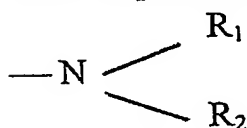
et dans la formule duquel

- 5 -  $Q_1$  représente un noyau indolique, un noyau morpholinique ou thiomorpholinique rattaché par son atome d'azote, un hétérocycle



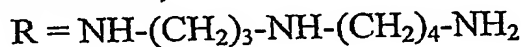
10

où  $R_1$  représente H,  $COCH_3$ , un radical alkyl en  $C_1-C_4$ , ou encore



- 15 où  $R_1$  a les significations ci-dessus indiquées et  $R_2$  représente H ou un radical alkyl en  $C_1-C_4$ ,  $R_1$  et  $R_2$  pouvant constituer ensemble un cycle pipéridinique, pyridinique, pipérazinique éventuellement substitué par un radical alkyl en  $C_1-C_4$ , ou encore un hétérocycle pyrrolique ou pyrrolidinique comportant un atome d'azote et 4 atomes de carbone.

- 20 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_5$  et  $C_6$  est double,



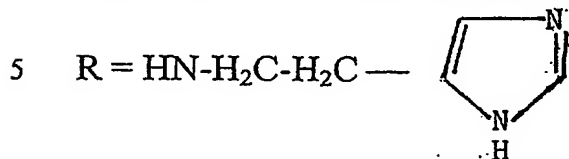
et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$ .

- 25 3. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_5$  et  $C_6$  est double et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$  et  $R = NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ .

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_7$  et  $C_8$  est double et  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  et  $R$  sont les mêmes que pour la revendication 2.

5. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_7$  et  $C_8$  est double et  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  et  $R$  sont les mêmes que pour la revendication 3.

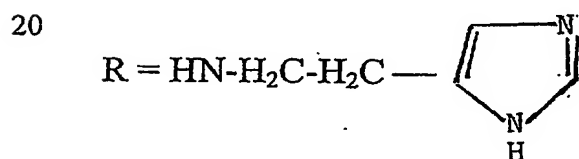
6. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_5$  et  $C_6$  est double et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$  et



7. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_7$  et  $C_8$  est double et  $T_1, T_2, T_3$  et  $R$  sont les mêmes que pour la revendication 6.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_7$  et  $C_8$  est double et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$  et  $R = -NH-(CH_2)_4-$   
15  $NH_2$ .

9. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_7$  et  $C_8$  est double et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$  et



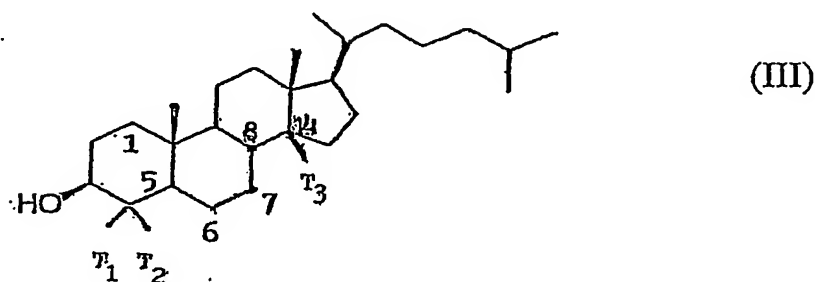
25

10. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_5$  et  $C_6$  est double et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$  et  $R = NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$ .

30 11. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il correspond à la formule (I) dans laquelle la liaison entre les carbones  $C_5$  et  $C_8$  est double et  $T_1 = T_2 = T_3 = H$  et  $R = NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ .

35 12. Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que :

- dans une première étape, on fait agir l'acide meta-chloroperoxybenzoïque, dissout dans un solvant A, sur un composé répondant à la formule (III)



15 formule dans laquelle le carbone en position 4 du squelette cholestérol porte des éléments  $T_1$ ,  $T_2$ , qui peuvent être indépendamment H ou  $\text{CH}_3$  avec  $\text{CH}_3$  en  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , le carbone en position 14 porte un élément  $T_3$ , qui peut être H ou un  $\text{CH}_3$  en  $\beta$ , l'une au moins des liaisons entre les carbones 5 et 6, d'une part, et 7 et 8, d'autre part, est double, le composé de formule III étant dissous dans un solvant B miscible au solvant A,

- 20
- dans une deuxième étape, on fait agir sur le composé époxy obtenu par la première étape, dissous dans un solvant C en présence d'un activateur D, une amine de formule  $\text{Q}_0\text{Q}_1$ ,  $\text{Q}_0$  et  $\text{Q}_1$  ayant les significations indiquées dans la revendication 1, dissoute dans un solvant E miscible au solvant C.
- 25

13. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que l'on purifie le produit obtenu dans la première étape avant de l'utiliser pour la deuxième étape.

14. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme activateur D, le perchlorate de lithium.

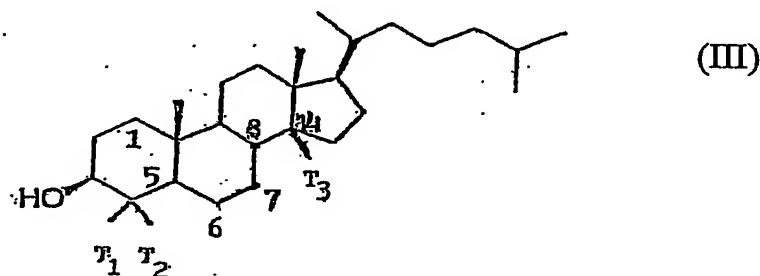
30

15. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme solvant A, le chlorure de méthylène.

16. Procédé selon la revendication 5, pour la préparation d'un composé de formule (I) portant un OH sur le carbone en position 5 et comportant une double liaison entre les carbones 7 et 8, caractérisé par

35

- dans une première étape, on fait agir l'acide meta-chloroperoxybenzoïque, dissout dans un solvant A, sur un composé répondant à la formule (III)



- 15
- formule dans laquelle le carbone en position 4 du squelette cholestérol porte des éléments  $T_1$ ,  $T_2$ , qui peuvent être indépendamment H ou  $\text{CH}_3$ , avec  $\text{CH}_3$  en  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , le carbone en position 14 porte un élément  $T_3$ , qui peut être H ou un  $\text{CH}_3$  en  $\beta$ , l'une au moins des liaisons entre les carbones 5 et 6, d'une part, et 7 et 8, d'autre part, est double, le composé de formule III étant dissous dans un solvant B miscible au solvant A,
- 20
- dans une deuxième étape, on fait agir sur le composé époxy obtenu par la première étape, dissous dans un solvant C en présence d'un activateur D, une amine de formule  $\text{Q}_0\text{Q}_1$ ,  $\text{Q}_0$  et  $\text{Q}_1$  ayant les significations indiquées dans la revendication 1, dissoute dans un
- 25

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé par le fait que l'on purifie le produit obtenu dans la première étape avant de l'utiliser pour la deuxième étape.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme activateur D, le perchlorate de lithium.

30

15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme solvant A, le chlorure de méthylène.

16. Procédé selon la revendication 15, pour la préparation d'un composé de formule (I) portant un OH sur le carbone en position 5 et comportant une double liaison entre les carbones 7 et 8, caractérisé par

35

le fait que l'on utilise, comme solvant B, un mélange de chlorure de méthylène et d'une solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

5 17. Procédé selon la revendication 5, pour la préparation d'un composé de formule (I) portant un OH sur le carbone en position 5 et comportant une simple liaison entre les carbones 7 et 8, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme solvant B, du chlorure de méthylène.

10 18. Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme solvant C, de l'éthanol anhydre ou de la pyridine, la réaction de la deuxième étape étant réalisée au reflux, à la pression atmosphérique.

19. Médicament pour la production de vacuoles sécrétoires dans des cellules tumorales d'un organisme vivant, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11.

15 20. Médicament pour augmenter la dendritogénèse en vue de l'activation du système immunitaire d'un organisme vivant, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11.

20 21. Médicament selon l'une des revendications 19 ou 20, utilisé pour la régression d'une tumeur cancéreuse de mammifère.

22. Médicament selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé par le fait qu'il est administré par injection.

23. Médicament selon la revendication 22, caractérisé par le fait que l'injection s'effectue à proximité de la tumeur à traiter.

25 24. Médicament selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisé par le fait qu'il est administré à des doses allant de 8,5 ng/g d'organisme traité à 1,7  $\mu\text{g/g}$  d'organisme à traiter.

30 25. Composition pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comporte, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, un médicament selon l'une des revendications 1 à 19.

le fait que l'on utilise, comme solvant B, un mélange de chlorure de méthylène et d'une solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

17. Procédé selon la revendication 15, pour la préparation d'un composé de formule (I) portant un OH sur le carbone en position 5 et comportant une simple liaison entre les carbones 7 et 8, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme solvant B, du chlorure de méthylène.

18. Procédé selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme solvant C, de l'éthanol anhydre ou de la pyridine, la réaction de la deuxième étape étant réalisée au reflux, à la pression atmosphérique.

19. Médicament pour la production de vacuoles sécrétoires dans des cellules tumorales d'un organisme vivant, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11.

20. Médicament pour augmenter la dendritogénèse en vue de l'activation du système immunitaire d'un organisme vivant, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11.

21. Médicament selon l'une des revendications 19 ou 20, utilisé pour la régression d'une tumeur cancéreuse de mammifère.

22. Médicament selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé par le fait qu'il est administré par injection.

23. Médicament selon la revendication 22, caractérisé par le fait que l'injection s'effectue à proximité de la tumeur à traiter.

24. Médicament selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisé par le fait qu'il est administré à des doses allant de 8,5 ng/g d'organisme traité à 1,7  $\mu\text{g/g}$  d'organisme à traiter.

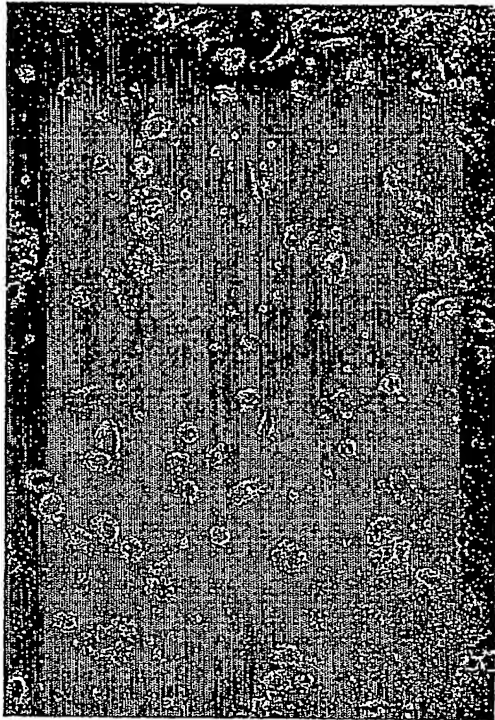
25. Composition pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comporte, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, un médicament selon l'une des revendications 19 à 24.



FIG. 1

1/8

Contrôle

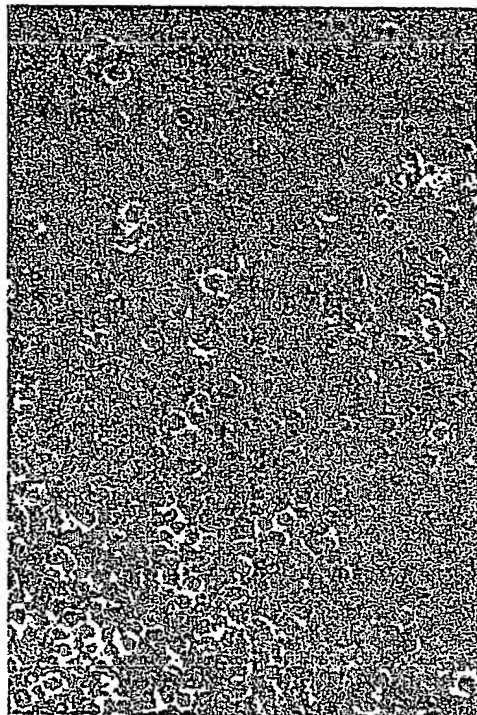


Composé testé



FIG. 2

Contrôle



Composé testé

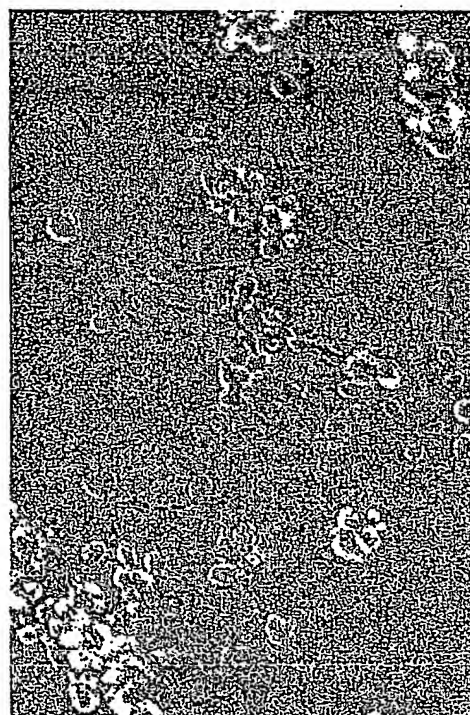


FIG. 3

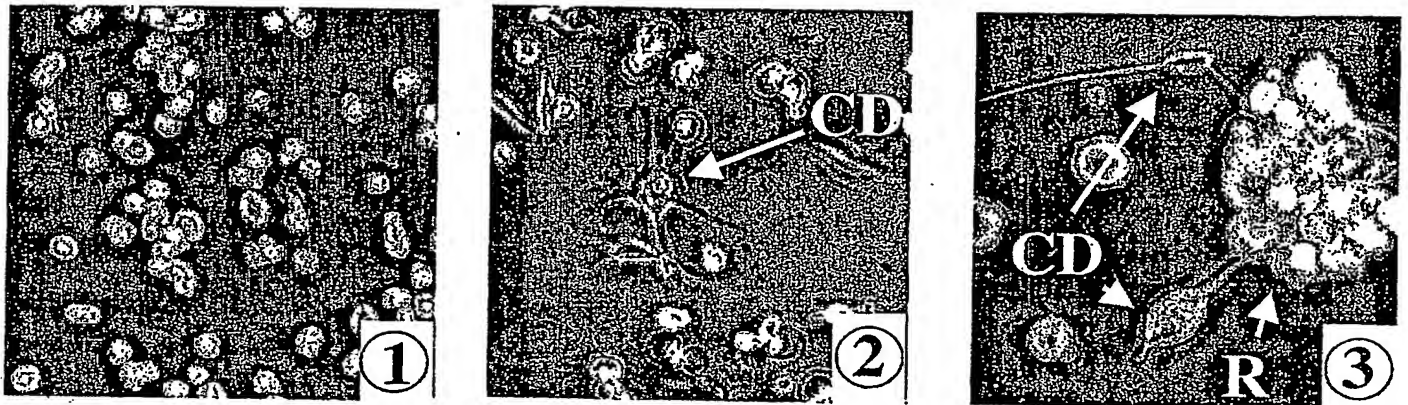
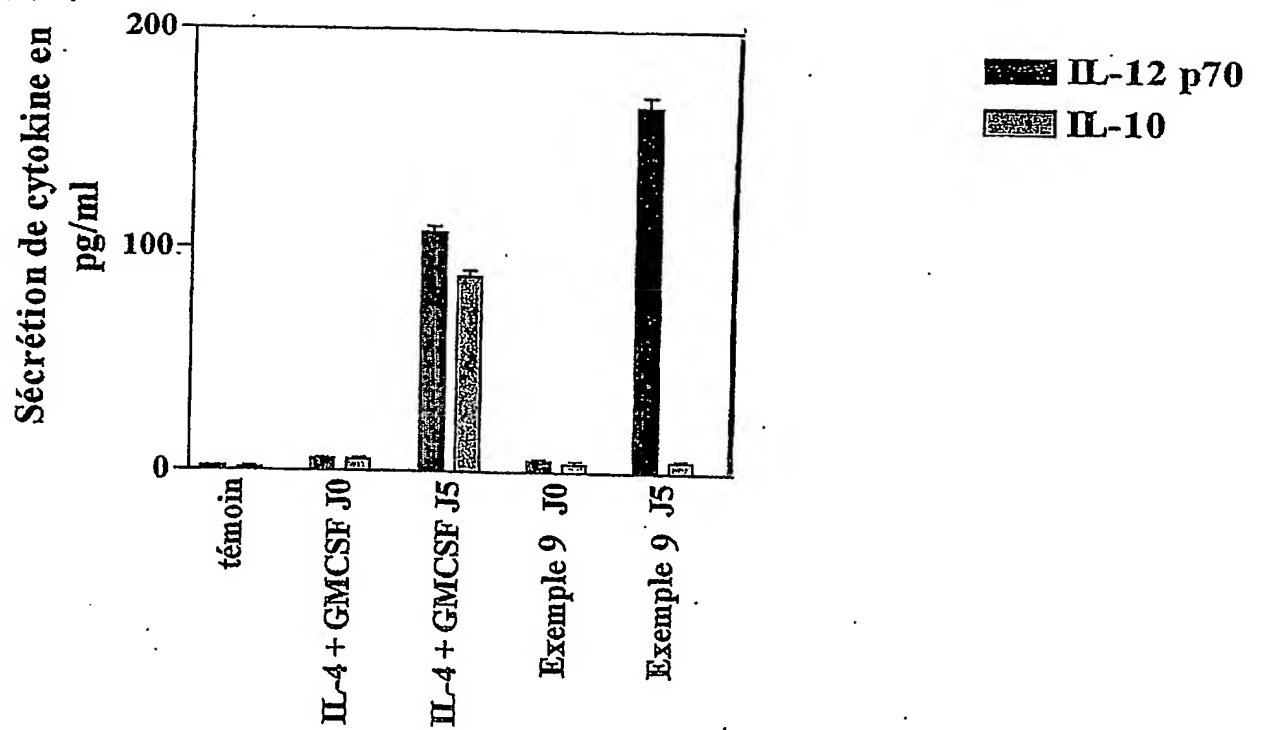


FIG. 4



3/8

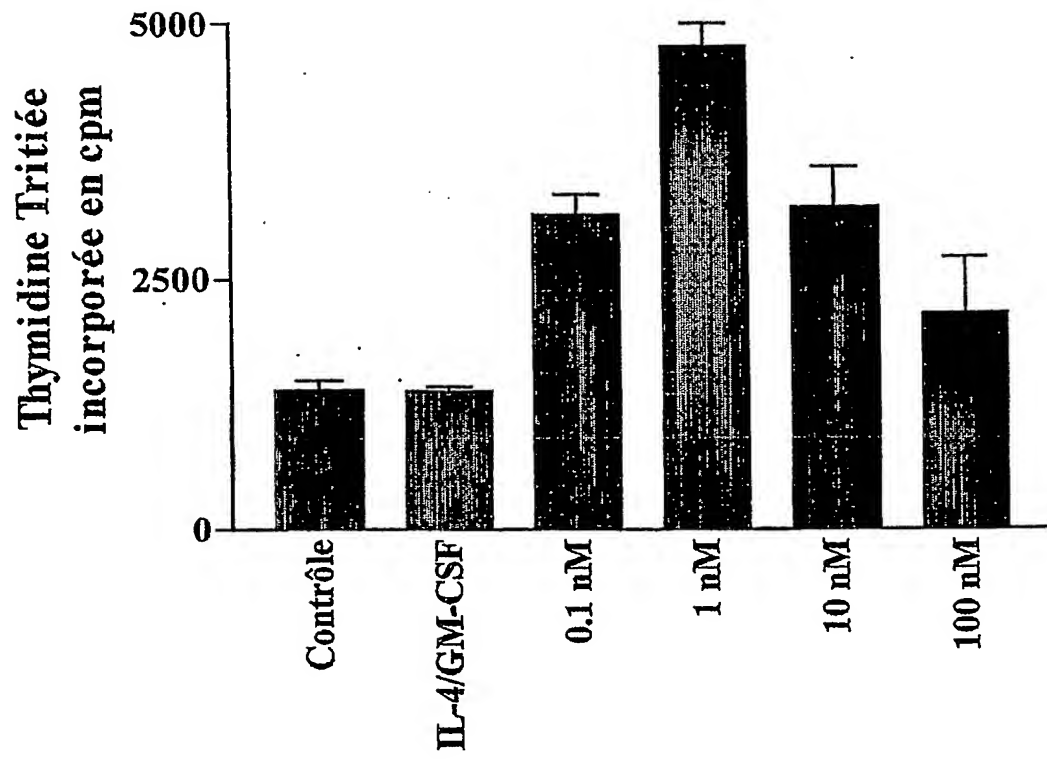


FIG. 5

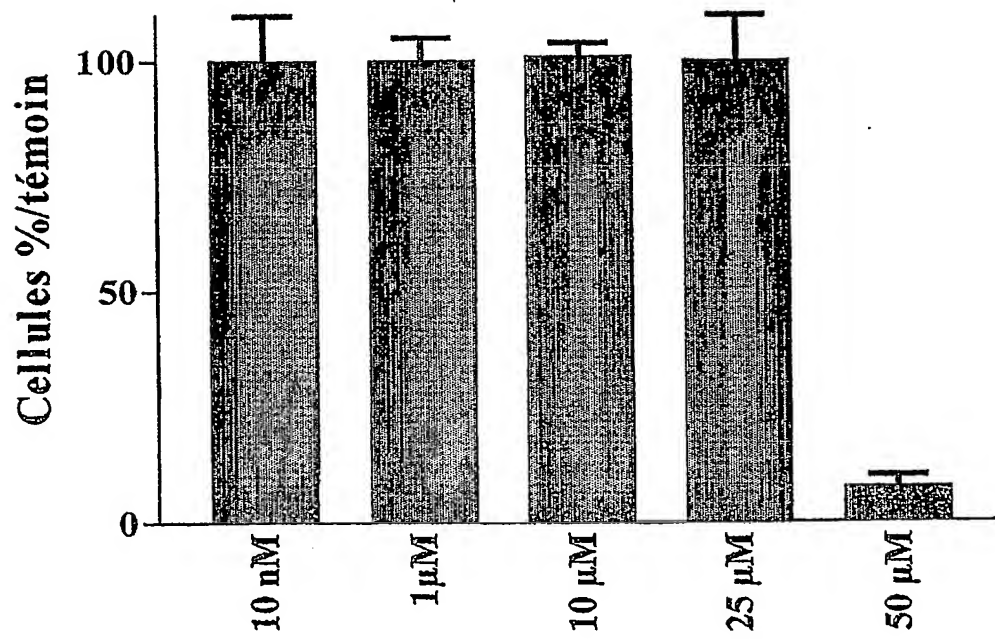


FIG. 6

FIG. 7

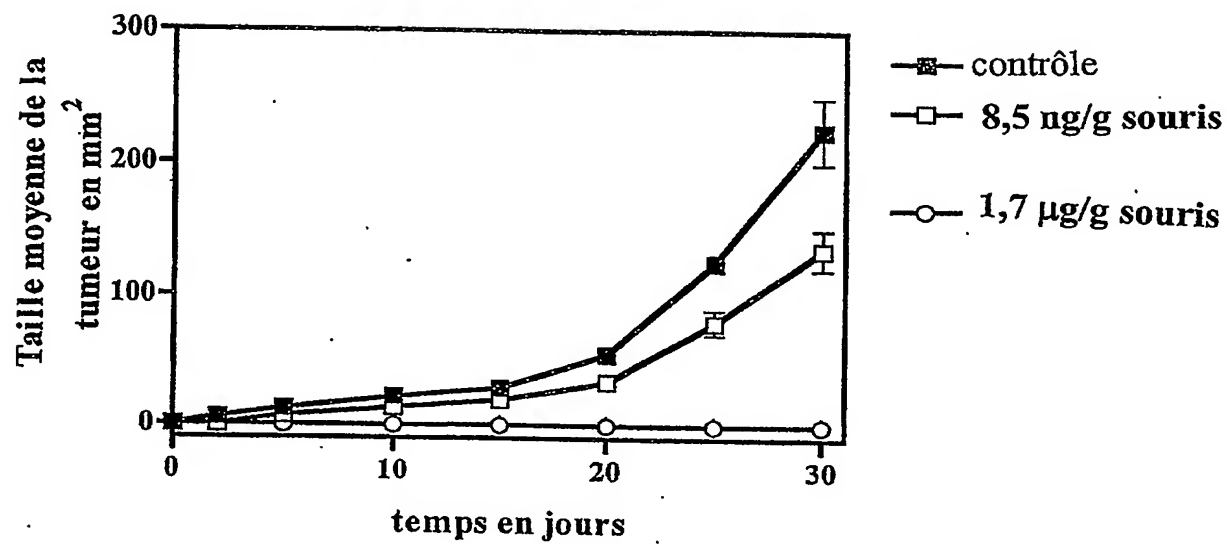


FIG. 8

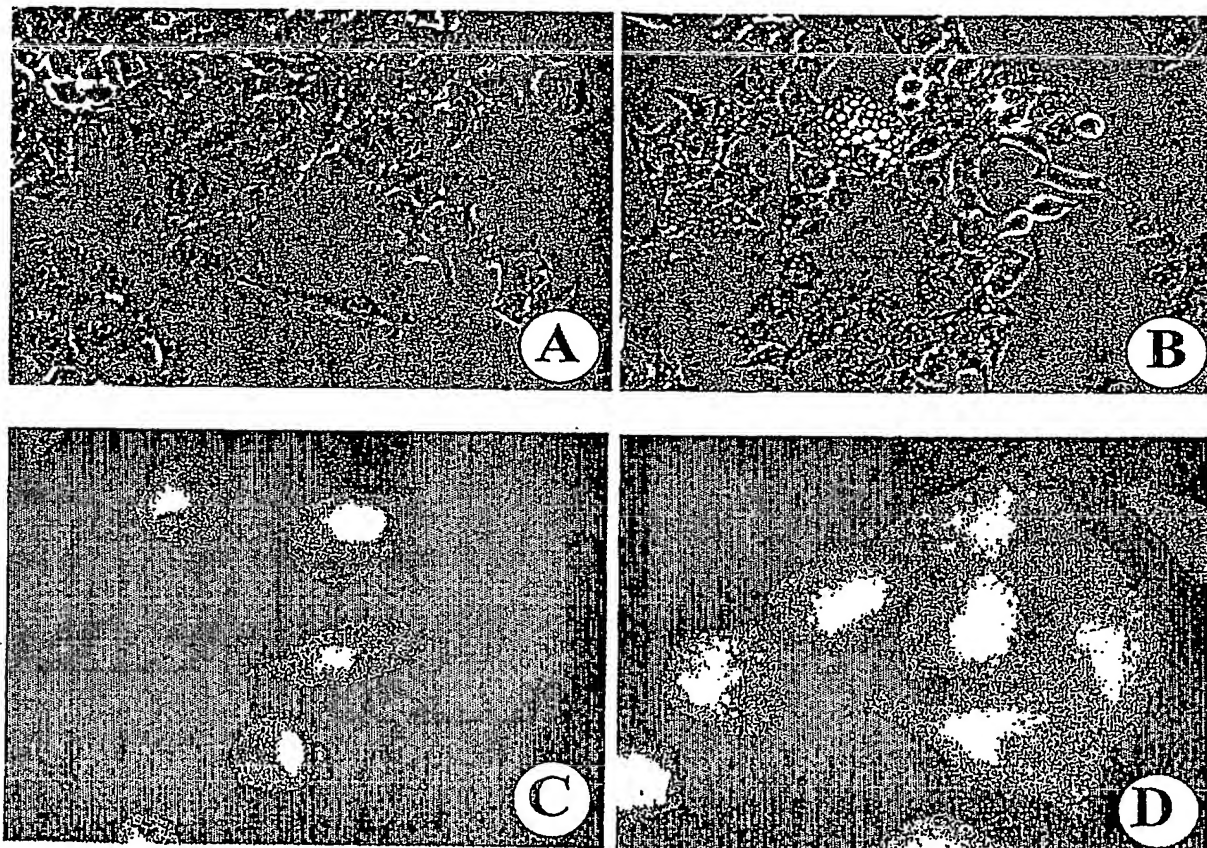


FIG. 9

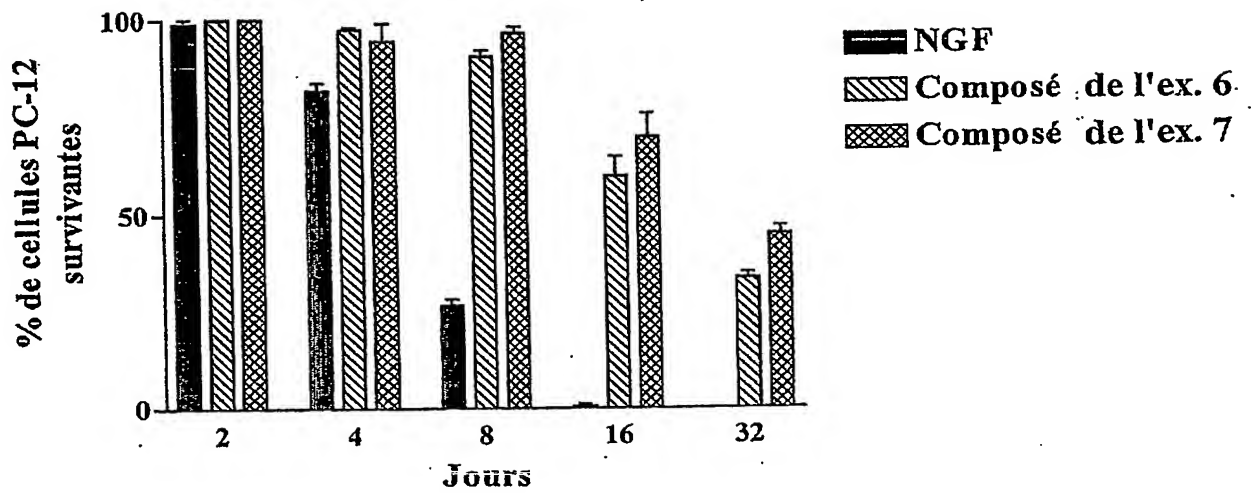


FIG. 10

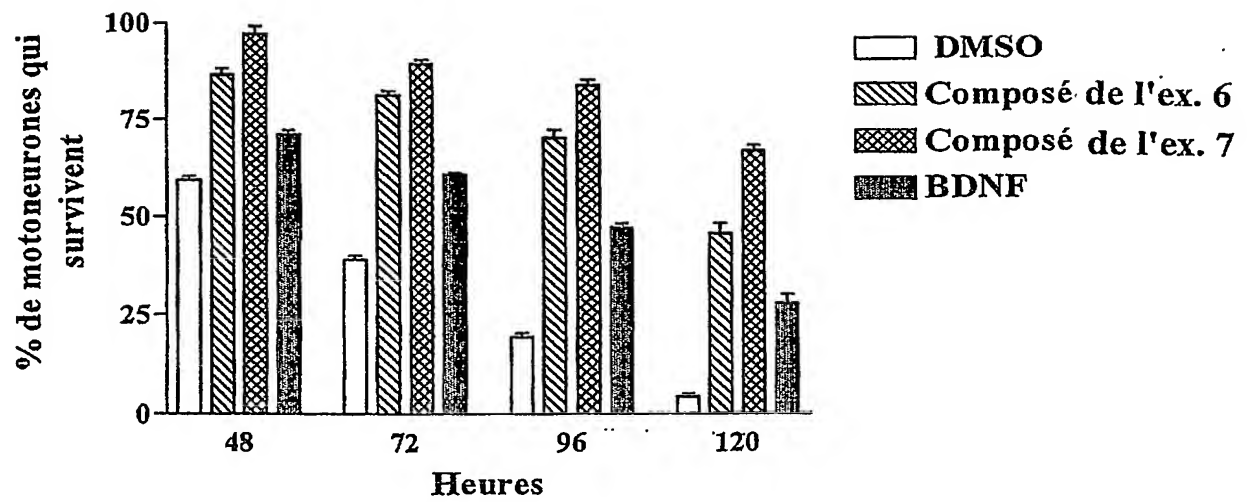




FIG. 11

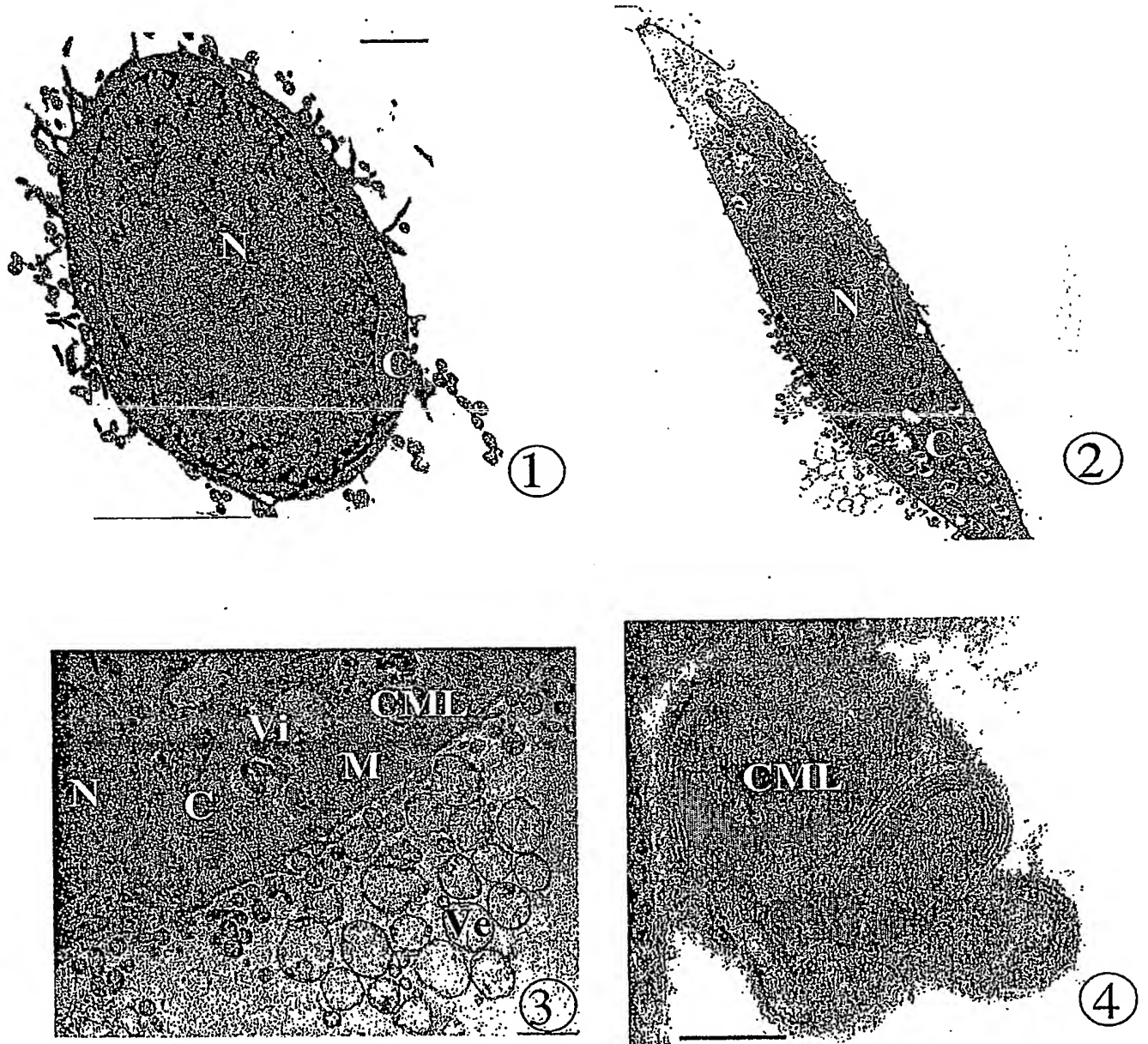


FIG. 12

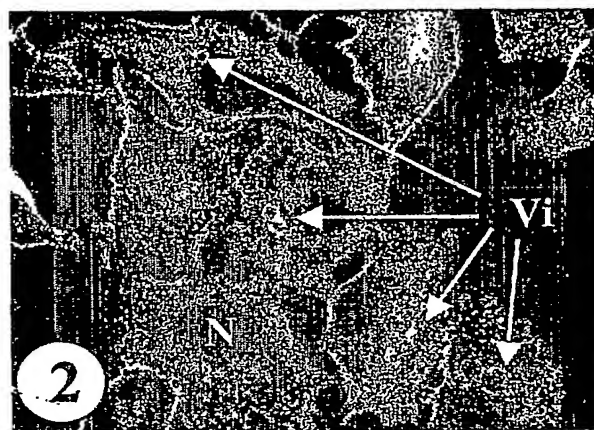


FIG. 13

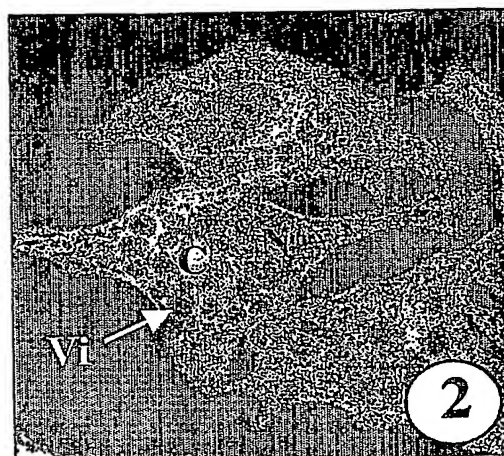
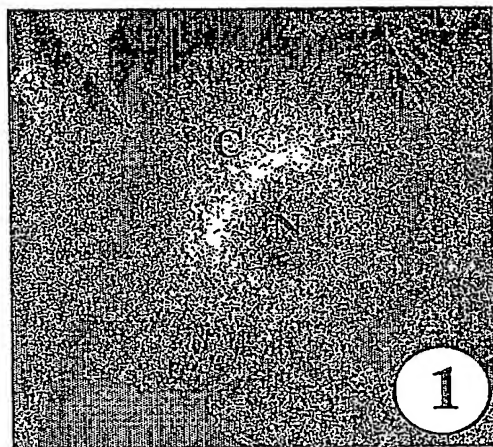


FIG. 14

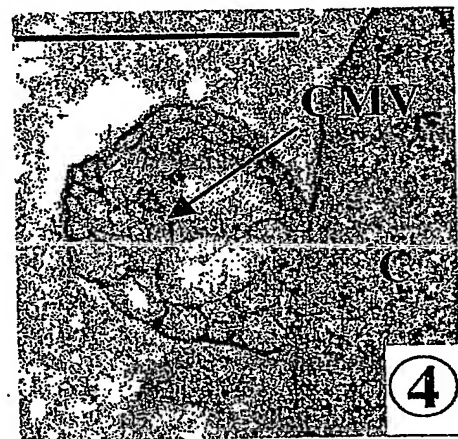
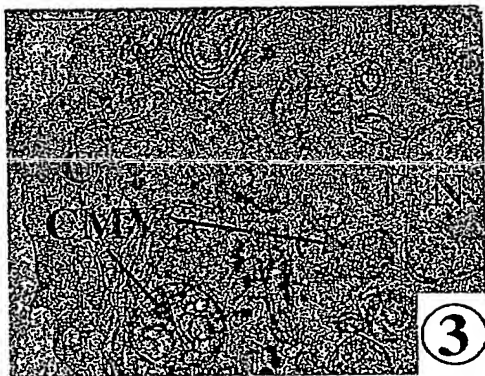
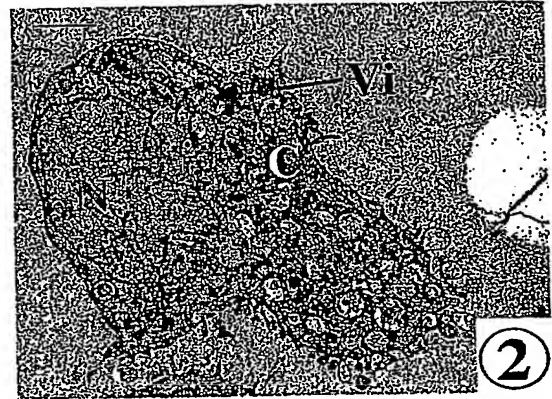
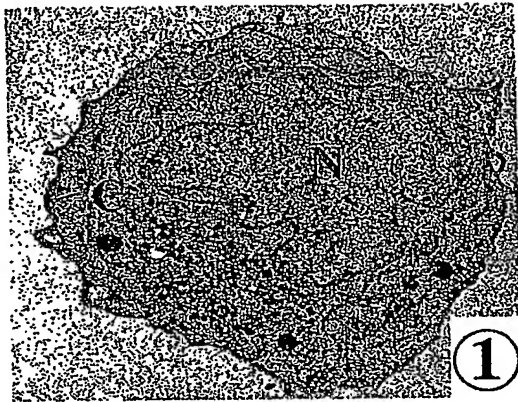


FIG. 15

